Best Available Copy

世界知的所有権機関

PCT

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国原特許分類6

C12N 15/87, 5/10, C07K 14/78

(11) 国際公開番号

W096/17073

A1

(43) 国際公開日

1996年6月6日(06.06.96)

(21) 国家出版香号

PCT/JP95/02425

(22) 国際出版日

1995年11月29日(29.11.95)

(30) 優先権データ

转顺平6/317721

1994年11月29日(29.11.94)

Л

(71) 出版人(米国を除くすべての指定国について)

實酒造株式会社

(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP]

〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)

(72) 発明者;および

(75) 発明者/出版人(米国についてのみ)

编野仁一(HASHINO, Kimikazu)[JP/JP]

〒569 大阪府高槻市明野町27-3 Osaka, (JP)

松下秀之(MATSUSHITA, Hideyuki)[JP/JP]

〒525 世賀県草津市西渋川2丁目12-1

ハーモパレス草準401号 Shiga, (JP)

加藤都之進(KATO, Ikmeshin)[JP/JP]

〒611 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP)

(74) 代理人

并理士 青山 葆,外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区域兒1丁目3番7号

IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)

(81) 指定国

AL, AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, 欧州特许(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特许(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特许(KE, LS, MW, SD, SZ, UG).

최付公開書類

国際調査報告書

(54) Tile: PROCESS FOR PRODUCING TRANSFORMED CELL

(54) 尭明の名称 形質転換細胞の製造方法

(57) Abstract

A process for producing transformed cells by introducing foreign genes into target cells through piercing, which comprises the step of culturing the target cells having the foreign genes injected thereinto in the presence of a cell adhesion-active substance; and a kit for producing transformed cells suitable for use in the above method and containing as the essential ingredients the cells to be transformed with foreign genes by this method and a cell adhesion-active substance.

(57) 要約

穿孔法を用いて外来遺伝子を標的細胞に導入し、形質転換細胞を製造するに際し、標的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質の存在下で培養する工程を包含する外来遺伝子による形質転換細胞の製造方法、該方法によって製造される外来遺伝子による形質転換細胞および細胞接着活性物質を必須の構成成分とする該方法で使用するに適した形質転換細胞製造用キットを開示する。

明細書

形質転換細胞の製造方法

技術分野

本発明は、形質転換細胞の製造方法、さらに詳しくは、細胞工学、遺伝子工学、発生工学などの分野において標的細胞への外来遺伝子導入を効率 良く行うことを可能にする方法に関する。

背景技術

標的細胞内への外来遺伝子導入方法には、リン酸カルシウム法、DEA Eーデキストラン法、リボソーム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法などが知られている。いずれの方法も操作法、効率、細胞に対するダメージなどの点で一長一短がある。中でもエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等の穿孔法は、特別な試薬を用いることなく細胞の取扱いが可能であり、導入効率も良好である。しかしながら、穿孔による細胞のダメージは免れない。

本発明の目的は、穿孔法により標的細胞内へ外来遺伝子を導入して形質 転換細胞を製造する際の、導入効率を向上させる方法を提供することにあ る。さらに、該方法に用いるキットを提供することも目的とする。

発明の概要

本発明の第1の発明は形質転換細胞の製造方法に関する発明であって、 穿孔法を用いて形質転換細胞を製造する方法において、穿孔法を用いて標 的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質 の存在下で培養する工程を包含することを特徴とする。

本発明の第2の発明は、本発明の製造方法で製造される外来遺伝子による形質転換細胞に関する発明である。

また、本発明の第3の発明は、形質転換細胞製造用キットに関する発明であって、上記第1の発明の形質転換細胞の製造方法に使用するキットであって、細胞接着活性物質を含有することを特徴とする。

発明の詳細な説明

本発明の方法は、穿孔法を用いて標的細胞に外来遺伝子を導入した後に、細胞接着活性を有する物質の存在下この細胞を培養することを特徴とする。

本発明において穿孔法とは、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等であり、細胞壁の穿孔により、遺伝子を注入する方法である。エレクトロポレーション法とは、例えば、蛋白質、核酸、酵素、第31巻、第1591~1603頁(1986)に記載の方法であり、マイクロインジェクション法とは、例えば、セル(Cell)、第22巻、第479~488頁(1980)に記載の方法であり、パーティクルガン法とは、例えば、テクニーク(Technique)、第3巻、第3~16頁(1991)に記載の方法であり、細胞に遺伝子を導入する方法として使用する公知の方法を包含する。

これらの穿孔法で使用される細胞としては、例えば、動物細胞を公知 [日本生化学会編: "新生化学実験講座18 細胞培養技術"、(第1版) (1990)東京化学同人発行]の方法で調製すれば良く、また、培養動 物細胞を使用しても良い。

細胞接着活性物質とは、細胞接着活性、すなわち標的細胞を細胞、あるいは組織内にある細胞間を満たす物質である細胞外マトリックス、またプラスチックやガラスなどの器質に接着させる活性を有する物質をいい、本

発明においては、標的細胞の形質転換に悪影響を及ぼさない限り、いずれの該活性を有する物質も使用できる。かかる活性とは、細胞をその形態を保持して、あるいは伸展、すなわち一またはそれ以上の方向に細胞が伸び、その形態が変化した状態で、例えば細胞接着活性物質を被覆した培養器具に固定する活性である。

細胞接着活性物質と標的細胞の結合は慣用の方法を使用して同様にアッセイすることができる。例えば、このような方法にはネイチャー(Nature)、352:438~441(1991年)に記載された方法が含まれる。簡単に言えば、細胞接着活性物質はブラスチック皿上を被覆しており、そしてアッセイすべき細胞集団は培地に重層して30分から2時間置く。このインキュペーション期間後に、接着していない細胞を回収し、計数しそして生存性についてアッセイする。細胞接着活性物質と接着した細胞もトリプシンまたは細胞解離緩衝液(例えば、Gibco)を使用して回収し、計数しそして生存性を試験する。次に、接着細胞の割合を計算しそしてウシ血精アルブミン(BSA)被覆ブラスチック皿のような標準乃至標準対照と比較する。標的細胞とアッセイした細胞接着活性物質の実質的な接着によって、細胞接着活性物質/細胞の組合せを決定できる。または細胞伸展活性は、上記操作中、接着した細胞をトリプシンまたは細胞解離緩衝液を用いて解離させる前にその形態変化を顕微鏡下で観察することによって測定することができる。

細胞接着活性物質としては、例えば、細胞接着活性ポリペプチドまたは 該ポリペプチドの機能的同等物や細胞接着合成ポリマーが挙げられる。

本発明に使用する細胞接着活性を有するポリペプチドとしては、例えば、インベイシン、ポリリジン等の細胞外マトリックス由来以外の細胞接着活性ポリペプチド、例えば、特開平2-311498号公報に記載の細胞伸

展活性を示すポリペプチド、例えば、フィブロネクチン、ラミニン、コラ ーゲン、ビトロネクチン、オステオポンチン、トロンボスポンジン、テネ イシン等の細胞外マトリックスの構成成分等がある。細胞外マトリックス 構成成分は公知の方法 [インターナショナル ジャーナル オブ キャン サー(International Journal of Cancer)、第20巻、第1~5頁(19 77) 、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、第254巻、第9933~9937頁(197 9) 、日本生化学会編: "統生化学実験講座 第6巻 細胞骨格の構造と 機能(下)*、(第1版)(1986)東京化学同人発行、セル ストラ クチャー アンド ファンクション (Cell Structure and Function)、第 13巻、第281~292頁(1988)、ジャーナル オブ バイオロ ジカル ケミストリー、第264巻、第18202~18208頁(19 89)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第260巻、 第12240~12245頁(1985)]で、天然物、培養物より調製 することができる。細胞接着活性ポリペプチドとしては、実質的に純化さ れた細胞接着活性を示す細胞外マトリックス、実質的に純化された細胞外 マトリックスフラグメントまたはそれらの混合物でも良く、細胞接着活性、 細胞伸展活性を有するタンパク質、ポリペプチドおよびその機能的同等物 を使用することができる。

これらの細胞接着活性ポリペプチドは、実質的に純化された天然物を使用しても良く、その酵素学的、化学的分解物、またこれらの物質を遺伝子工学的に作成したものを使用しても良い。さらに、これらの物質の機能、すなわち細胞接着活性、細胞伸展活性を損なうことなく改変した物も使用することができる。なお本発明において、天然起源のポリペプチドのアミノ酸配列のアミノ酸が欠失、置換、付加および/または挿入のいずれか一

つがなされていても所望の細胞接着活性、細胞伸展活性を有するポリペプチドを天然アミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的同等物という。すなわち、天然に存在するタンパク質にはそれをコードする遺伝子の多形や変異によりアミノ酸配列に変化が生じたものの他に、生成後のタンパク質の生体内および精製中の修飾反応などによって、そのアミノ酸配列中にアミノ酸の欠失、挿入、付加、置換等の変異が起こったものも含まれるが、それにも関わらず変異を有しないタンパク質と実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に差異があっても、その主要な機能を共通にしていると認められるものを機能的に同等の活性を有するポリペプチドと呼ぶ。

人為的にタンパク質のアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合でも同様であり、この場合はさらに多種多様の変異体を作製することが可能であるが、変異を有しないものと実質的に同等の生理活性を示す限り、これらの変異体は機能的に同等の活性を有するポリペプチドと解釈される。

たとえば、大腸菌で発現されたタンパク質のN末端に存在するメチオニン残基は、多くの場合、メチオニンアミノペプチダーゼの作用により除去されるとされているが、タンパク質の種類によってはメチオニン残基を持つもの、持たないものの両方が生成される。しかしながら、このメチオニン残基の有無はタンパク質の活性に影響を与えない場合が多い。また、ヒトインターロイキン2(IL-2)のアミノ酸配列中の、あるシステイン残甚をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン2活性を保持することが知られている[サイエンス(Science)、第224巻、1431頁(1984)]。

さらに、遺伝子工学的にタンパク質の生産を行う際には、融合タンパク質として発現させることがしばしば行われる。たとえば、目的のタンパク

質の発現量を増加させるために、目的のタンパク質のN末端に他のタンパク質由来のN末端ペプチド鎖を付加したり、目的のタンパク質のN末端、あるいはC末端に適当なペプチド鎖を付加して発現させ、この付加したペプチド鎖に親和性を持つ担体を使用することにより、目的のタンパク質の精製を容易にすることなどが行われている。

この点に関して、関連パイオテクノロジー技術は、対象の機能的領域中のアミノ酸の欠失、置換、付加または他の修飾を定型的に実施することができる状態にまで進歩している。次に、得られたアミノ酸配列は所望の細胞接着活性または細胞伸展活性について、上記の方法により定型的にスクリーニングすることができる。

細胞接着活性を有するポリペプチドは、分子内に細胞接着活性に必要なアミノ酸配列、例えば、配列表の配列番号1(RGDS)で表されるアミノ酸配列、配列表の配列番号2(CS1)で表されるアミノ酸配列、配列表の配列番号6(ラミニンの中心配列、YIGSR)で表されるアミノ酸配列より選択されるアミノ酸配列を含有する人工のポリペプチドでも良く、これらのポリペプチドは遺伝子工学的方法、化学合成方法で大量に調製でき、純化されたポリペプチドとして使用することができる。

分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平1-180900号公報に記載の配列表の配列番号7で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドは、Escherichia coli HB101/pTF1409 (FERM BP-1939)を用いて該公報に記載の方法により調製することができる。また、下記表1に示す各配列表の配列番号で表されるポリペプチドも、各公報記載の遺伝子工学的方法により調製することができる。

なお、表1中の Escherichia coli HB101/pCHV90が含有す

るプラスミド HB101/pCHV90は、Escherichia coli HB101/pHD101 (FERM BP-2264) および Escherichia coli JM109/pTF7021 (FERM BP-1941) を用い、特開平5-271291号公報記載の方法により調製することができる。

=	4
蚕	1

WO 96/17073

表 1			
公開公報	配列表の	生産菌	寄託番号
	配列番号	(Escherichia coli)	
		·	
特開平1-206998号	配列番号8	JM109/pTF7021	FERN BP-1941
特開平1-261398号	配列番号9	HB101/pTF1801	FERM P-9948
特開平2-97397号	配列番号3	JN109/pTF7221	FERM BP-1915
特開平2-152990号	配列番号10	JM109/pTFB800	FERM BP-2126
特開平2-311498号	配列番号11	HB101/pCH101	FERN BP-2799
特開平3-59000号	配列番号12	JW109/pCF406	FERM P-10837
特開平3-232898 号	配列番号13	HB101/pCE102	FERM P-11226
特開平4-54199号	配列番号14	JM109/pTF7520	FERM P-11526
		+VN-IN. TAA	
	配列番号15	JM109/pTF7520	
		+Col*1	FERN P-11527
特開平5-271291号	配列番号16	HB101/pCHV179	FERM P-12183
	配列番号17	HB101/pCHV90	
	配列番号18	HB101/pCHV89	FERN P-12182
特開平5- 97698号	配列番号19	JM109/pTF7520ColV	FERM BP-5277
特 開平5-178897号	配列番号20	JW109/pYWH-CF - /	FERM BP-5278

また、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドは化学合成することもでき、例えば、特開平3-173828号公報に記載のポリRGDSを合成、使用しても良い。

分子内に配列表の配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平 2-311498 号公報に記載の配列表の配列番号 4 で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドは Escherichia coli HB 101/p HD 102 (FERM P-10721)を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製することができる。また、特開平 3-284700 号公報に記載の方法に従い、配列表の配列番号 2 で表されるポリペプチドを化学合成しても良い。

さらに、分子内に配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列および配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列を含有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平2-311498号公報に記載の配列表の配列番号21で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドは Escherichia coli HB101/pCH102(FERM BP-2800)を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製することができる。また、特開平3-284700号公報に記載の配列表の配列番号5で表されるポリペプチドも分子内に配列表の配列番号1、2のアミノ酸配列を含有するポリペプチドであり、該ポリペプチドは Escherichia coli HB101/pCS25(FERM P-11339)を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製できる。

以上のように、本発明に使用するポリペプチドの例としては、分子内に 配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列 番号2で表されるアミノ酸配列を含有する細胞接着活性ポリペプチドがあ り、該ポリペプチドとしては、例えば、ヒト・フィブロネクチンの細胞接 着ドメイン [モッシャー、D. F. (Nosher、D. F.) 編: "フィブロネクチン" (Fibronectin)、第47~121頁(1989)アカデミックプレス (Academic Press)発行]由来ポリペプチドと同CS1ポリペプチド(同上刊行物)が共有結合したもの、CS1ポリペプチドを含有するヘパリン結合ドメイン(同上刊行物)由来ポリペプチド、あるいは細胞接着由来ポリペプチドを使用することができ、これらはそれぞれ遺伝子工学的に作製することができる。例えば、細胞接着ドメイン由来ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、CS1ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、CS1ポリペプチドをコードするDNAを含むベクターから、それぞれ必要な領域を取出し、単独あるいは組合せて使用することにより、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を含有するボリペプチドと分子内に配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドが共有結合したポリペプチドを作製する場合、ポリペプチド間の共有結合は、直接結合であってもよく、間接結合、例えば、スペーサーを介した間接結合であってもよい。スペーサーは、各領域の分子間距離を調節するための挿入配列であり、任意のペプチド鎖を用いることができ、例えば、フィブロネクチン分子中のCS1領域の上流配列であってもよい。スペーサー配列は遺伝子工学的に容易に導入することができる。

細胞接着合成ポリマーとしては、例えば、公知のポリーN-p-ビニルベンジル-D-ラクトンアミド (PVLA) が挙げられる。

本発明において、標的細胞は特に限定するものではないが、例えば、造

血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血細胞、ES細胞、リンパ球、癌細胞等が 挙げられる。

外来遺伝子も、特に限定するものではなく、例えば、タンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞内抗体をコードする核酸、偽(デコイ)遺伝子から選択される核酸が挙げられ、本発明においては、外来遺伝子はベクターに組み込まれていてもよい。

ベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルス ベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター等が 挙げられる。

本発明によれば、常法に従って穿孔法によって外来遺伝子を導入した標的細胞を、細胞接着活性物質の存在下で培養することにより、該遺伝子が導入された形質転換細胞を効率よく得ることができる。細胞培養方法としては使用する細胞により、公知の方法から選択すれば良い。例えば細胞接着活性ポリペプチドの存在下で細胞培養を行う場合、培養液中に $250\sim200\mu$ g/mlの細胞接着活性ポリペプチドを含有させ、常法に従い培養すれば良い。

特に、細胞接着活性物質を被覆した培養器具を用いて培養するのが好ましい。培養器具とは、通常に細胞を培養する目的に使用する器具であれば良く、例えば、培養皿、マイクロキャリアー使用の培養器具、繊維状の中空糸使用の培養器具である。培養器具への該物質の被覆方法としては塗布しても良く、散布しても良い。例えば、細胞接着活性ポリペプチドの培養器具への被覆は容易に行うことができ、該ポリペプチドを例えばリン酸緩衝生理食塩水(PBS)のような適当な溶液に溶かし、培養器具に添加し、適当時間静置することで培養器具にポリペプチドを被覆できる。培養器具

に被覆するポリペプチド量としては $50\sim1000\,\mathrm{pmol/cm^2}$ の範囲、好適には $150\sim600\,\mathrm{pmol}$ の範囲より選択すれば良い。

細胞接着活性物質の存在下で培養した形質転換細胞は培養物中より常法 により得ることができ、形質転換細胞を効率よく製造することができる。

得られた形質転換細胞は、細胞の遺伝子組換え技術を用いる有用物質の 生産、疾患モデルの開発、遺伝子治療等に有用であり、本発明により、効 率よく形質転換細胞が提供される。

また、細胞接着活性物質を含有するキットを使用することにより、本発明を簡便に行うことができる。キット中に含有される細胞接着活性物質は溶液でも良く、凍結乾燥品でも良い。キット中には細胞接着活性物質の溶解、希釈用緩衝液、細胞培養培地、細胞培養器具等を含有させても良い。例えば本発明の方法に用いるポリペプチド類、ポリペプチド希釈用PBS、培養器具等をまとめてキットとしておくことにより、簡便に、形質転換細胞の製造を行うことができる。キットに含める試薬は、溶液状でも凍結乾燥物でもよい。

なお、本発明で使用する穿孔法としての、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等は、目的に応じて適 宜選択、使用できる。

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれ ら実施例に限定されるものではない。

実施例1

1. 細胞接着活性ポリペプチドの培養皿への塗布

配列表の配列番号3で表されるポリペプチド(以下C274と称す)、 配列表の配列番号4で表されるポリペプチド(以下H296と称す)およ び配列表の配列番号5で表されるポリペプチド(以下C・CS1と称す) WO 96/17073 PCT/JP95/02425

をそれぞれ 1μ Mとなるようにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶かし、 0.22μ mのフィルター (マイレクスーGV、ミリポア社) を用いて滅 関した。

これらの溶液をそれぞれ 24 穴のポリスチレン製培養皿(コーニング社製)に 1 m 1 / ウェルとなるように添加し、4 $\mathbb C$ 、一晩コートした。この培養皿は、以下に記載の形質転換細胞を添加する前に、ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地 $500\mu1$ / ウェルでリンスした。

2. 細胞の形質転換

10%ウシ胎児血清を含むダルペッコ改変最少基本培地で培養したヒト 類表皮癌A-431細胞の培養皿(直径100mm)2枚分をそれぞれ1 0mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地でリンスし た後、0.25%ウシ・トリプシンと0.02%EDTAを含むPBSを 3m1添加して細胞を培養皿よりはかした。これらに、それぞれ7mlの ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地を加えた後、800 rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児 血清を含むダルベッコ改変最少基本培地に懸濁し800rpm、3分遠心 して細胞を集めた。得られた細胞を合せて、10mlのPBSに懸濁し、 その10分の3量を取り、二分した後、それぞれを800rpm、3分違 心して細胞を集めた。得られた細胞を再度、10mlのPBSに懸濁し、 800грm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞の一方は、無菌 的に調製されたpCAT-コントロール (control)ベクター (プロメガ社) 15 ugを含む1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー(パイオラッ ド社) 用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中で10分放置 した。もう一方の細胞は、1m1のPBSに懸潤した後、ジーンパルサー (バイオラッド社) 用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中

で10分放置した。それぞれの細胞は、氷中10分放置後、250V、960 μ Fで電圧を印加した。印加後、細胞をキュベットのまま氷中で10分放置した。この後、15m1の10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地中へ細胞を回収し、上記のポリペプチドをコートした24穴のポリスチレン製培養皿に1m1/ウエルとなるように添加した。これらの細胞を5%炭酸ガス存在下、37 $^{\circ}$ で一晩培養した後、培地をアスピレーションで除去し、新たに10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地を1m1/ウエルとなるように加え、5%炭酸ガス存在下、37 $^{\circ}$ で一晩培養した。

3. 形質転換効率(遺伝子導入効率)の測定

培養した細胞は、1ウエル当り1.25m1のPBSで3回リンスし、
CAT-ELISAキット(ベーリンガー・マンハイム社製)を用い、本
キットの使用方法に従い、細胞溶解液を調製し発現CATの検出を行った。
本キットは、西洋ワサビのペルオキシダーゼ標識の2次抗体と基質として
ABTSを用いているので405mm/490mmを測定し、エレクトロ
ポレーションの際、PCAT-コントロールベクターを添加しなかったも
のをブランクとして用い、各区のPCAT-コントロールベクターを添加
したものの値からブランク値を引いた値を発現CAT量とした。

この結果を図1に示す。すなわち、図1は各ポリペプチド処理区での細胞への遺伝子導入効率を示す図であり、縦軸に無処理区、各ポリペプチド処理区が示され、横軸は405nmの吸光度と490nmの吸光度比で遺伝子導入効率が示されている。

図1に示すように、上記C274、H296、C・CS1処理区では無処理の培養皿に比べて発現CAT量は高く、pCATーコントロールベクターの細胞への導入効率が高いことが示された。

実施例2

1. 細胞接着活性ポリペプチドの培養皿への塗布

2. 細胞の形質転換

10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地で培養したアフリカミドリザル腎COS-7細胞の培養皿(直径100mm)2枚分をそれぞれ10mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地でリンスした後、0.25%ウシ・トリブシンと0.02%EDTAを含むPBSを3ml添加して細胞を培養皿よりはがした。これらに、それぞれ7mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地を加えた後、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地に懸濁し800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を合せて、12mlのPBSに懸濁し、その6分の5量を取り、二分した後、それぞれを800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を、6mlのPBSに懸濁し、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を、6mlのPBSに懸濁し、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を、6mlのPBSに懸濁し、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞の一方は、無菌的に調製されたpCAT-コントロール(control)ベクター(プロメガ社)

15μgを含む1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー(パイオラッド社)用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、水中で10分放置した。もう一方の細胞は、1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー(バイオラッド社)用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中で10分放置した。それぞれの細胞は、氷中10分放置後、250V、960μFで電圧を印加した。印加後、細胞をキュベットのまま氷中で10分放置した。この後、15mlの10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地中へ細胞を回収し、上記のポリペプチドをコートした24穴のポリスチレン製培養皿に1ml/ウエルとなるように添加した。これらの細胞を5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した後、培地をアスピレーションで除去し、新たに10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地を1ml/ウエルとなるように加え、5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。

3. 形質転換効率 (遺伝子導入効率) の測定

培養した細胞は、1ウエル当り1.25m1のPBSで3回リンスし、
CAT-ELISAキット(ベーリンガー・マンハイム社製)を用い、本キットの使用方法に従い、細胞溶解液を調製し発現CATの検出を行った。本キットは、西洋ワサビのペルオキシダーゼ標識の2次抗体と基質としてABTSを用いているので405mm/490mmを測定し、エレクトロポレーションの際、PCAT-コントロールベクターを添加しなかったものをブランクとして用い、各区のPCAT-コントロールベクターを添加したものの値からブランク値を引いた値を発現CAT量とした。この結果を図2に示す。すなわち、図2は各ポリペプチド処理区での細胞への遺伝子導入効率を示す図であり、縦軸に無処理区、各ポリペプチド処理区が示され、横軸は405mmの吸光度と490mmの吸光度比で遺伝子導入効

WO 96/17073 PCT/JP95/02425

率が示されている。

図2に示すように、上記C274、H296、C・CS1処理区では無処理の培養皿に比べて発現CAT量は高く、pCATーコントロールベクターの細胞への導入効率が高いことが示された。

実施例3

キットの作製

表 2

形質転換細胞製造用キット

試薬A・・・100μM	C 2 7 4	150μ1
試薬B・・・100μM	H 2 9 6	150 µ 1
試薬C・・・100μM	C · C S 1	150 µ l
試薬希釈液・・・PBS		45 m l
2.4 穴ポリスチレン製培園	ŧm	3枚

以上記載したごとく、本発明によれば、細胞への遺伝子導入を目的とする従来法の問題点を解決し、標的細胞への外来遺伝子導入効率を向上させた形質転換細胞製造方法が提供できる。また、該方法に使用する形質転換細胞製造用のキットも提供することができる。

WO 96/17073 PCT/JP95/02425

図面の簡単な説明

図1は、ヒト類表皮癌A-431細胞へのpCAT-コントロールベクターの導入における細胞接着活性ポリペプチド処理の遺伝子導入効率に対する効果を示すグラフである。

図2は、アフリカミドリザル腎COS-7細胞へのpCAT-コントロールベクターの導入における細胞接着活性ポリペプチド処理の遺伝子導入効率に対する効果を示すグラフである。

配列番号:1

配列の長さ:4

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Arg Gly Asp Ser

1

配列番号:2

配列の長さ:25

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His

15

5

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

20 25

配列番号:3

配列の長さ:274

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser lle Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly He Asp Phe Ser Asp He Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg lle Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser lle Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser lie Val Ala Leu Asn Gly Arg

Glu Glu Ser Pro Leu Leu lie Gly Gin Gin Ser Thr Val Ser Asp 180 175 170 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu 195 190 185 Leu lie Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg 205 200 lle Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe 215 220 225 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr lle Ser Gly Leu Lys 235 240 230 Pro Gly Val Asp Tyr Thr lie Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg 255 245 250 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg 265 270 260

Thr Glu Ile Asp

配列番号:4

配列の長さ:296

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Ala lie Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gin Val Thr Pro

5 10 15

Thr	Ser	Lei	S	er	Ala	Gln	Trp	Thr	Pro	Pro	Asn	Val	Gln	Leu	Thr
					20					25					30
Gly	Tyr	Ar	g V	al	Arg	Val	Thr	Pro	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Pro	Met
					35					40					45
Lys	Glu	П	e /	Asn	Leu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Va 1	Val	Val	Ser
					50					55					60
Gly	Leu	Me	ŧ,	Val	Ala	Thr	Lys	Tyr	Glu	Val	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu
					65	ı				70)				75
Lys	Asp	Th	r	Leu	Thr	Ser	λrg	Pro	λla	Gin	Gly	Val	Val	Thr	Thr
					80					85					90
Leu	Glu	ı As	n	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Arg	Val	Thr	Asp	Ala
					95	ı				100					105
Thi	r Gli	u Ti	ır	Thr	ile	The	rlle	Ser	Trp	Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr
					110)				115	<u>;</u>				120
П	e Th	r G	l y	Phe	Gir	V a	l Asi	Ala	yal	Pro	Ala	Asn	Gly	Gln	Thr
					125	5				130)				135
Pr	o li	e G	l n	λrg	Thi	Н	e Ly:	s Pro	qzk c	Val	Arg	Ser	Tys	Thr	lle
					140)				145	5				150
Th	r Gl	y L	eu	Glr	n Pro	o G I	y Th	r Ası	р Туг	Lys	. I l e	: Tyr	Leu	Ty	Thr
					15	5				160)				165
Le	z A u	n A	s p	λsı	n Al	a Ar	g Se	r Se	r Pro	o Va	l Va	1 116	. 421	Ala	a Ser
					17	0				17	5				180
Th	ir Al	a i	l e	As	p Al	a Pr	o Se	r As	n Le	u Ar	g Ph	e Lei	ı Al	z Th	r Thi
					18	5				19	0				193

Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp	Gin	Pro	Pro	Arz	Ala	Arg	lle
				200					205					210
Thr	Gly	Tyr	He	lle	Lys	Tyr	Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg
				215					220					225
Glu	V a l	Val	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Gly	Va l	Thr	Glu	Ala	Thr	He
				230					235					240
Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Giy	Thr	Glu	Tyr	Thr	lle	Tyr	Val	lle	Ala
				245					250					255
Leu	Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser	Glu	Pro	Leu	l I e	Gly	Arg	Lys	Lys
				260					265					270
Thr	Asp	Glu	Leu	Pro	Gin	Leu	Val	Thr	Leu	Pro	His	Pro	Asn	Leu
				275					280					285
His	Gly	Pro	Glu	lle	Leu	Asp	Val	Pro	Ser	Thr				
				290					295					

配列番号:5

配列の長さ:302

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lle Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

/al	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Va 1	Va İ-	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	The	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95	ı				100					105
Thr	Va	His	s Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	He	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110)				115					120
Ιlε	e Arg	g Hi	s His	s Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Gli	Asp
				125					130					135
Ar	g Va	1 Pr	o Hi	s Se	r Arş	s yzı	n Sei	rile	Thr	Lei	ı Thi	r Ası	n Lei	Thr
				14	0				145	5				150
Pr	o Gl	y Th	r Gl	и Ту	r Va	s V	l Se	rile	. Val	Ala	Lei	וצל נו	n Gl	y Arg
				15	5				160)				155
GI	u Gl	u Se	r Pr	o Le	u Le	u [l	e GI	y Gla	n Gli	n Sei	r Th	r Va	l Se	r Asp
				17					173					180
۷a	l Pr	o Ar	g As	p Le	u Gl	u Va	l Va	1 Ala	a Al	a Th	r Pr	o Th	r Se	r Leu
				18	5				19	0				195

PCT/JP95/02425 WO 96/17073

> Leu lie Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg 210 205 200 lle Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gin Glu Phe 225 215 220 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys 235 240 230 Pro Gly Val Asp Tyr Thr ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg 250 255 245 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro lle Ser lle Asn Tyr Arg 265 270 260 Thr Glu lie Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gin Leu Val Thr 275 280 Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro 300 290 295

Ser Thr

配列番号:6

配列の長さ:5

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Tyr lie Gly Ser Arg

5 1

配列番号:7

配列の長さ:283

配列の型:アミノ酸

鎖の数: | 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro 15 1 5 10 Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu 30 25 20 Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp 40 35 Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu 55 50 Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser 70 65 Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys 85 80 Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly lie Asp Phe Ser Asp lie Thr 100 95 Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp lle Ala Pro Arg Ala Thr lle 110 115 Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg 130 135 125

Pro	Arg	Glu	Åsp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	He	Thr	Leu
				140					145					150
Thr	Asn	Leu	Thr	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	Ala
	_			155					150					165
Leu	Asn	Gly	Arg	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Cin	Gln	Ser
				170					175					180
Thr	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	λsp	Leu	Glu	Val	Val	λla	Ala	Thr
				185					190					195
Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Vai	Thr	Vai
				200					205					210
Arg	Tyr	Tyr	Arg	lie	Thr	Tyr	Gly	Clu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro
				215					220					225
Val	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lie
				230					235					240
Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Ciy	Val	Asp	Tyr	Thr	l l e	Thr	Val	Tyr	Ala
				245					250					255
V a !	Thr	Gly	Arg	Cly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser
				260					265					270
lle	λsn	Tyr	Arg	Thr	Glu	ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Cln	Met		
				275					280					

配列番号:8

配列の長さ:279

配列の型:アミノ酸

鎖の数: | 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Het Arg 15 10 5 ì Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 30 25 20 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 40 35 Ser lie Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 55 50 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln 70 65 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 85 80 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe 95 100 Thr Val His Trp lle Ala Pro Arg Ala Thr lle Thr Gly Tyr Arg 115 110 lle Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp 135 130 125 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser lle Thr Leu Thr Asn Leu Thr 150 145 140 Pro Cly Thr Glu Tyr Val Val Ser lie Val Ala Leu Asn Gly Arg 165 160 155

WO 96/17073 PCT/JP95/02425

Glu Glu Ser	Pro Leu	Leu II	e Gly	Cln (Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
	170				175					180
Val Pro Arg	Asp Leu	Glu Va	l Val	Ala .	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
	185	ì			190					195
Leu lle Se	Trp Asp	Ala Pr	o Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
	200)			205					210
lle Thr Ty	r Gly Glu	Thr Gi	y Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
	215	5			220					225
Thr Val Pr	o Gly Se	r Lys Se	er Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
	230)			235					240
Pro Gly Va	l Asp Ty	r Thr [le Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
	24	5			250					255
Gly Asp Se	r Pro Al	a Ser Si	er Lys	Pro	He	Ser	Ile	λsn	Tyr	Arg
	26	0			265					270
Thr Glu []	e Asp Ly	s Pro S	er Cin	Met						
	27	5								

配列番号:9

配列の長さ:474

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Ala	Val	Pro	Pro	Pro	Thr	qzA	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro
1				5					10					15
Asp	Thr	Met	Arg	Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu
				20					25					30
Thr	Asn	Phe	Leu	Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp
				35					40					45
Val	Ala	Glu	Leu	Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu
				50					55					60
Thr	Asn	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser
				65					70					75
Val	Tyr	Clu	Gln	His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys
				80					85	j				90
Thr	Gly	Lei	gzA ı	Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr
				95	•				100)				105
λla	a Asr	s Se	r Phe	. The	· Val	His	Trp	lle	. Ala	Pro) Arg	Ala	Thr	lle
				110)				113	5				120
Th	r Gly	y Ty	r Arg	g ile	e Arg	g His	His	s Pro	Gli	u His	s Phe	Ser	Gly	Arg
				125	5				130	0				135
Pr	o Ar	g Gl	ızk u	p Ar	g Va	l Pro	Hi:	s Ser	Ar	s yzı	n Ser	- 116	? The	Leu
				140)				14	5				150
Th	r As	n Le	u Th	r Pr	o Gl	y Thi	r Gl	и Туг	r Va	l Va	l Ser	- 110	e Va	l Ala
				15	5				16	0				165
Le	u As	n Gl	у Аг	g Gl	u Gl	u Se	r Pr	o Lei	u Le	u []	e Gly	y Gl	n Gli	n Sei
				17	0				17	5				180

Thr	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr
				185					190					195
Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	lie	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val
				200					205					210
Årg	Tyr	Tyr	Arg	lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro
				215					220					225
Val	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	ile
				230					235					240
Ser	Gly	Lev	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala
				245					250					255
Val	Thr	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser
				260)				265					270
He	. Ası	ı Ty	r Arg	Thr	Clu	ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Gln	Asn	Glu	Gly
				275	5				280					285
Lei	j Ási	n Gl	n Pro	o Thi	Asp	Asp	Ser	Cys	Phe	Asp	Pro	Tyr	Thr	Val
				290)				295	•				300
Se	r Hi	s Ty	r Al	a Va	1 Gly	, yet	Gli	u Trp	Glu	ı Arg	Met	Ser	Glu	. Sei
				30	5				310)				315
GI	y Ph	e Ly	s Le	u Le	u Cy:	s Cli	n Cy	s Lei	u Gly	/ Phe	Gly	Sei	Cly	y His
				32	0				325	5				330
Ph	e Ar	g Cy	s As	p Se	r Se	r Ar	g Tr	p Cys	s His	s Asp	λsn	Gly	Val	Ası
				33	5				34()				343
Ty	r Ly	's l	le Gl	y G1	u Ly	s Tr	e ye	p Ar	g Gla	n Gly	Glu	ızkı	Gly	/ Gli
				35	Ω				35	5				360

Het	Met	Ser	Cys	Thr	Cys	Leu	Gly	Asn	Gly	Lys	Gly	Glu	Phe	Lys
				365					370					375
Cys	λsp	Pro	His	Glu	Ala	Thr	Cys	Tyr	Asp	qzk	Gly	Lys	Thr	Tyr
				380					385					390
His	Val	Gly	Glu	Gln	Trp	Gin	Lys	Glu	Tyr	Leu	Gly	Ala	He	Cys
				395					400					405
Ser	Cys	Thr	Cys	Phe	Giy	Gly	Cln	λrg	Gly	Trp	Arg	Cys.	Asp	Asn
				410					415					420
Cys	Arg	Arg	Pro	Gly	Cly	Clu	Pro	Ser	Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Gly
				425					430					435
Gin	Ser	Tyr	Asn	Gln	Tyr	Ser	Gln	Arg	Tyr	His	Gln	Arg	Thr	Asn
				440	+				445					450
Thr	Asn	Val	Asn	Cys	Pro	lle	Clu	Cys	Phe	Met	Pro	Leu	Asp	Val
				455	i				460					465
Glr	n Ala	Asp	Arg	Gli	ı Asp	Ser	Arg	Glu						
				470)									

配列番号:10

配列の長さ:385

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

WO 96/17073 PCT/JP95/02425

Ala	Pro	He	Val	Asn	Lys	Val	Val	Thr	Pro	Leu	Ser	Pro	Pro	Thr
1				5					10					15
Asn	Ļeu	His	Leu	Glu	λla	λsn	Pro	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Thr	Val
				20					25					30
Ser	Trp	Glu	λrg	Ser	Thr	Thr	Pro	Asp	ile	Thr	Gly	Tyr	Arg	lle
				35					40					45
Thr	Thr	Thr	Pro	Thr	Asn	Gly	Gin	Gln	Gly	Asn	Ser	Leu	Glu	Glu
				50					55					60
Val	Val	His	Ala	Asp	Gln	Ser	Ser	Cys	Thr	Phe	Asp	Asn	Leu	Ser
				65					70					75
Pro	Gly	Leu	Glu	Tyr	λsn	Val	Ser	Val	Tyr	Thr	Val	Lys	Asp	Asp
				80					85					90
Lys	Glu	Ser	Val	Pro	He	Ser	Asp	Thr	ile	ile	Pro	Ala	V a i	Pro
				95					100					105
Pro	Pro	Thr	λsp	Leu	λrg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro	Asp	Thr	He t
				110					115					120
Arg	Val	Thr	îrp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	λsn	Phe
				125					130					135
Leu	Val	Arg	Tyr			Val	Lys	Asn	Glu	Glu	qzk	Val	Ala	Glu
				140					145					150
Leu	Ser	· He	Ser.			Asp	nzk o	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	
				155					160					165
Leu	Pro	Gly	/ Thr			Val	l Val	Ser			Ser	Val	Tyr	
				170)				175	•				180

Cln	His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu
				185					190					195
Ásp	Ser	Pro	Thr	Cly	He	Asp	Phe	Ser	Asp	lie	Thr	Ala	Asn	Ser
				200					205					210
Phe	Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	ile	Thr	Gly	Tyr
				215					220					225
Arg	He	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu
				230					235					240
Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	λrg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	λsn	Leu
				245					250					255
Thr	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly
				260					265					270
Arg	Glu	Clu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gin	Gin	Ser	Thr	Val	Ser
				275					280					285
Asp	Val	Pro	Årg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser
				290					295					300
Leu	Leu	lle	Ser	îrp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr
				305					310					315
Arg	l l e	Thr	Туг	Gly	Clu	Thr	Cly	Cly	Asn	Ser	Pro	Va l	Cla	Glu
				320					325					330
Phe	Thr	Val	Pro	Cly	Ser	Lys	Ser	Thr	sik	Thr	lle	Ser	Gly	Leu
				335					340					345
Lys	Pro	Gly	Val	Ąsρ	Tyr	Thr	lie	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly
				350					355					360

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro 11e Ser 11e Asn Tyr

365 370 375

Arg Thr Glu 11e Asp Lys Pro Ser Gln Met
380 385

配列番号:11

配列の長さ:549

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg 1 5 10 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 20 25 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 35 40 Ser lie Ser Pro Ser Asp Asm Ala Val Val Leu Thr Asm Leu Leu 55 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin 65 70 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 80 85 90

Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp.	lle	Thr	Ala	As n	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115				•	120
ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Cly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	He	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Giu	Tyr	Yal	Val	Ser	He	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	
				170					175					180
۷a۱	Pro	Arg	ASP	Leu	Glu	va l	l Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	
				185					190					195
Lei	. 110	e Se	r Trp	Asp	Ala	Pro	o Ala	a Val	The	· Val	Arg	Z Tyı	r Tyt	Arg
				200	İ				205					210
H	e Thi	Туг	Cly	Clu	The	Gly	/ Gly	nzk '	Ser	Pro	Val	Gir	Glo	Phe
				215	,				220)				225
Th	r Vai	l Pro	o Gly	Ser	Lys	Se:	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Cla	Leu	Lys
				23.0)				235	i				240
Pre	o Gly	y Va	l Asp	Tyr	The	118	2 Thr	Val	Tyr	Ala	Val	The	Cla	Arg
				245	j				250)				255
Gl	ızk v	Se Se	r Pro	Ala	Sei	Sei	rlys	Pro	ile	Ser	lle	: Asr	Туг	Arg
				260)				265	•				270

Thr	Glu	He	Asp	Lys	Pro	Ser	Меl	Ala	He	Pro	Ala	Pro	Thr	λsp
				275					280					285
Leu	Lys	Phe	Thi	Gin	Val	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Trp
				290					295					300
Thr	Pro	Pr	Ası	n Val	Cin	Leu	Thr	Gly	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Thr
				305					310					315
Pro	Lys	G1	u Ly	s Thr	Gly	Pro	Met	Lys	Glu	lle	Asn	Leu	Ala	Pro
				320)				325					330
Asp	Ser	Se	r Se	r Val	Val	V a l	Ser	Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys
				335	5				340					345
Tyr	Gli	ı Ya	l Se	r Va	lTyr	Ala	Leu	Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg
				35)				355					360
Pro	Ala	a Ci	n Gi	y Va	i Val	Thr	Thr	Leu	Glu	Asn	Val	Ser	Pro	Pro
				36	5				370	t .				375
År	g Ar	g Al	a Ai	g Va	l Th	r Ast	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	[le	Thr	lle
				38	0				385	5				390
Se	r Tr	p A	rg Ti	ar Ly	s Th	r Gli	u Thi	rlle	Thr	Cly	Phe	Gin	۷a	l Asp
				39	5				400)				405
Al	a Va	l P	ro A	la As	n Gl	y Gl	n Th	r Pro	110	e Glr	Arg	Thr	- 11	e Lys
				4 1	0				415	5				420
Pr	o As	p V	alλ	ra Se	r Ty	r Th	r []	e Th	r Gl	y Lei	, Glr	n Pro	GI	y Thr
				42	25				43	0				435
λs	p Ty	ır L	ys i	le T	r Le	u Ty	r Th	r Le	z.k. u	n As	p As	n Ala	a Ar	g Ser
				4.	10				44	5				450

Ser	Pro	Val	Val	lie	Asp	λla	Ser	Thr	λla	lle	Asp	Ala	Pro	Ser
				455					460					465
Asn	Leu	Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	λsn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser
				470					475					480
Trp	Gin	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	lle	Thr	Gly	Tyr	ile	lle	Lys	Tyr
	•			485					490					495
Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Glu	Val	Val	Pro	Arg	Pro	Arg
				500					505					510
Pro	Gly	Val	Thr	Clu	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr
				515	i				520					525
Giu	Туг	Thr	lle	Tyr	Val	lle	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gin	Lys	Ser
				530)				535	ı				540
Glu	Pro	Lei	ile	Cls	/ Ars	lys	Lys	Thr	•					
				545	5									

配列番号:12

配列の長さ:422

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val	Thr	Trp	λla	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	ASP	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	λsp	Va I	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gin
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	λsp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	ile	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
lΙε	. Arg	, His	s His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	YLZ	Glu	
				125)				130					135
Arg	y Vai	l Pro	o His	s Ser	λrg	. Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	
				140					145					150
Pro	o Gl	y Th	r Gli			l Val	Ser	rile			Leu	ASN	Gly	
				155					160					165
GI	u Gi	u Se	r Pr			u lle	e Gly	y Glr			Thr	· Val	Ser	
				170					173		•	. ተ ዩ	- C -	180
۷a	l Pr	o Ar	zk g			sV u	ı Va	ı Ala			r Pro	ותו כ	7 261	
				18	5				190	J				195

Leu	He	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	λla	Val	Thr	V a l	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
He	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Va	l Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	λla	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	λsp	Se	r Pro	λla	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	He	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Gli	ı 11	e Ası	Lys	Pro	Ser	Met	Ala	Asn	Glu	Gly	Leu	Asn	Gln
				275	i				280					285
Pro	Th	r As	p As	p Ser	Cys	Phe	Asp	Pro	Tyr	Thr	Vai	Ser	His	Tyr
				290)				295					300
Ala	a Va	l Gl	y As	p Glo	; Trp	Glu	Arg	. Met	Ser	Glu	Ser	Gly	Phe	Lys
				309	5				310					315
Le	u le	u Cy	's GI	n Cy	s Lei	u Gly	Phe	Cly	Ser	Gly	His	Phe	: Arg	Cys
				32	0				325					330
λs	p Se	r Si	er Ar	g Tr	р Су	s His	i ksi	p Asn	Cly	Val	Ası	п Туг	Lys	ile
				33					340					345
GI	y G	iu L	ys Ti	p As	pλr	g Glo	n Gl	y Glu	ı Ası	Gly	/ Gli	n Me	: Me	i Ser
				35	•				35					360
Су	s Ti	hr C	ys L	eu Gl	y As	n Gl	y Ly	s Gl	y Glo	u Ph	e Ly	s Cy	s As	p Pro
				36	5				370	0				375

 His Glu Ala Thr
 Cys Tyr Asp Asp Gly Lys Thr Tyr His Val Gly

 380
 385

 Glu Gln Trp Gln Lys Glu Tyr Leu Gly Ala lle Cys Ser Cys Thr

 395
 400

 Cys Phe Gly Gly Gln Arg Gly Trp Arg Cys Asp Asn Cys Arg Arg

 410
 415

 420

配列番号:13

配列の長さ:332

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

 Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn IIe Gly Pro Asp Thr Met Arg

 1
 5
 10
 15

 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Pro Ser IIe Asp Leu Thr Asn Phe Leu 20
 25
 30

 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 35
 40
 45

 Ser IIe Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 50
 55
 60

 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin 65
 70
 75

His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Cin	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	He	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Årg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	۷al	Val	Ser	lle	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Clu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175					180
Vai	Pro	λrg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	A s p	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Vai	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
He	Thr	Tyr	Gly			Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	۷a۱	Gin	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	· Val	Pro	Gly			Ser	Thr	Ala			Ser	Gly	Leu	
_				230					235					240
Pro	Gly	/ Val	Asp			· [le	Thr	Val			Val	Thr	Cly	
				245	}				250	1				255

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro ile Ser lie Asn Tyr Arg 270 260 265 Thr Glu lle Asp Lys Pro Ser Met Ala Asn Ser Asp Ser Glu Cys 285 275 280 Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His Asp Gly Val Cys Mat 300 290 295 Tyr lie Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn Cys Val Val Gly 305 310 315 Tyr lle Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys Trp Trp Glu 320 325 330

配列番号:14

配列の長さ:341

Leu Arg

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lie Asp Leu Thr Asn Phe Leu
20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
35 40 45

Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	λsn	Ala	Val	ΙsV	Leu	Thr	λsn	Leu	Leu	
				50					55					60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Va l	Val	Ser	Va I	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln	
				65					70					75	
z i H	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp	
				80					85					90	
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	He	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe	
				95					100					105	
Thr	Val	His	Trp	lle	s I A	Pro	Arg	λla	Thr	ile	Thr	Gly	Tyr	Arg	
				110					115					120	
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp	
				125					130					135	
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	λsn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr	
				140					145					150	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	λla	Leu	Àsn	Gly		
				155	ı				160					165	
Glu	Glu	s Sei	Pro	Leu	Leu	ile	Gly	Gin			Thr	V z l	Ser		
				170					175					180	
۷a	Pro	o Ara	g Ast			Val	۱s۷	Ala			Pro	Thr	Ser		
			_	185					190			_	•	195	
Lei	. H	e Se	r Tri			Pro	Ala	a Val			Ar	з Туі	riyı	Arg	
		_		200		۵.	٥.		203		,,			210	
11	e Th	r îy	r Gl			Cly	r Gly	y Asn			o Va	ı Gli	n Gli	Phe	
				21	כ				220	J				225	

Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	ile	Ser	Gly	Leu	Lys
				230		,			235					240
Pro	Gly	Val	λsp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	lle	λsn	îyr	λrg
				260					255					270
Thr	Clu	lle	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Gly	lle	Tyr	ile	Ser	Gly	Met
				275					280					285
Ala	Pro	Arg	Pro	Ser	Leu	Thr	Lys	Lys	Cln	Arg	Phe	Arg	His	Arg
				290					295					300
Asn	yığ	Lys	Cly	Tyr	Arg	Ser	Gin	Arg	Gly	His	Ser	Arg	Gly	Arg
				305					310					315
Asn	Gln	Asn	Ser	Arg	Arg	Pro	Ser	Arg	Ala	Met	Trp	Leu	Ser	Leu
				320					325					330
Phe	Ser	Ser	Lys	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	λla				
				335					340					

配列番号:15

配列の長さ:446

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro	Asp	Thr	Het	Arg
ı				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	llε	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Głu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	G Ly	He	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	lie	Аlа	Pro	Arg	Ala	Thr	ile	Thr	Gly	Tyr	λrg
				110					115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	Нis	Phe	Ser	Gly	γιs	Pro	Arg	Glu	q z £
				125					130					135
Arg	. Val	Pro	His	Ser	Arg	λsn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	A s n	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Cly	Thr	Clu	Tyr	V a l	۷a۱	Ser	ile	Val	Ala	Leu	Asn	Giy	Arg
				155)				160)				165
Gli	ı Glu	ı Sei	r Pro	Leu	Leu	ılle	Gly	Gln	Clr	Set	Thr	Val	Ser	Asp
				170)				175	5				180

Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Clu	Val.	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	Ile	Ser	Trp	λsp	Ala	Pro	Ala	Va I	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Αsπ	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Giy	Arg
				245					250					255
Gly	lzk.	Se	r Pro	λla	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	lle	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
The	r Gli	וו ע	e Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Val	Pro	Gly	Phe	Lys	Gly	Asp
				275	ı				280					285
Мe	t GI	y le	u Lys	Gly	λsp	Arg	Gly	Glu	Val	Gly	Gln	lle	Gly	Pro
				290)				295					300
Ar	g Gi	у Хх	x Ası	o Gly	, Pro	Glu	Gly	Pro	Lys	Gly	yıs	Ala	Gly	Pro
				305	5				310					315
Th	r Gl	y As	p Pr	o Gly	Pro	Ser	Gly	Gln	Ala	Gly	Glo	Lys	Gly	Lÿs
				320)				325					330
Le	u Gl	y Va	el Pr	o Gi	y Lei	J Pro	Gly	Tyr	Pro	Gly	γιδ	Gin	Gly	2:0
				33	5				340)				345
Ĺy	s G	ly S	er în	r Gl	y Ph	e Pro	Gly	Phe	Pro	Cly	Ala	Asn	Gly	Gli
				35	n				355	;				360

Lys Gly Ala Arg Gly Val Ala Gly Lys Pro Gly Pro Arg Gly Gin 365 370 375 Arg Gly Pro Thr Gly Pro Arg Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Pro 380 385 390 Thr Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Thr Ser Gly Gly Asp Gly Pro 395 400 405 Pro Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Pro Gln Gly Pro Gln Gly Pro 410 415 Val Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Arg 425 435 430 Met Gly Cys Pro Gly His Pro Gly Gln Arg Gly 440 445

配列番号:16

配列の長さ:457

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg

i 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lie Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Vai	Lys	Asn	Glu	Glu	λsp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Va l	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Clu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Cly	Arg	Gin	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	ile	Asp	Phe	Ser	Asp	He	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
λrg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	7 Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	۷al	λla	Leu	A s n	Gly	Arg
				155	i				160)				165
Gli	s Glu	u Sei	r Pro	Leu	Leu	ile	Gly	Gln	Gin	Ser	Thr	۷al	Ser	Asp
				170)				175	,				180
Vа	l Pr	o Ar	3 42	p Le	u C I i	s¥ u	l Vz	l Ala	a Ala	a Thi	Pro	T i	r Se:	Leu
				18	5				190	0				195
Le	u II	e Se	r Tr	ak q	p Al	a Pr	o Al	a Va	l Th	r Va	i Ar	g īy	r Ty	r Arg
				20	0				20	5				210

ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	λla	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	λsp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	λla	Ser	Ser	Lys	Pro	ile	Ser	lle	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg
				275					280					285
Ala	l Arg	, Val	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	lle	Thr	lle	Ser	Trp
				290					295					300
Arg	3 Thi	r Lys	s Thr	Glu	Thr	lle	Thr	Cly	Phe	Gin	Val	λsp	alk	l sV-
				305	1				310					315
Pro	o Ala	a As	n Gly	Glo	Thr	Pro	1 1 e	Gln	Arg	Thr	lie	Lys	Pro	Asp
				320)				325	,				330
V a	l Ar	g Se	r Ty	r Thi	116	e Thr	Cly	leu	Gln	Pro	Gly	/ Thi	Asp	Tyr
				335	5				340)				345
Lу	5	e Ty	r Le	и Ту	r Th	r Lei	124	n Asp) Ası	ı Ala	Ar	g Se	r Sei	Pro
				350					355					360
۷z	l Va	1 11	e As	p Al	a Se	r Thi	r Ala	a Ile	e Ası	Al:	a Pr	o Se	r Ası	n Leu
				36					37					375
Αr	g Pin	ie Le	u Al	a Th	r Th	r Pr	ελ ο	n Sei	r Le	u Le	u Va	l Se	r Tr	p Gln
				38	0				38	5				390

Pro Pro Arg Ala Arg lie Thr Gly Tyr lie ile Lys Tyr Glu Lys 395 400 405 Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly 420 410 415 Val Thr Glu Ala Thr lie Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr 425 430 Thr lie Tyr Val lie Ala Leu Lys Asn Asn Gin Lys Ser Glu Pro 450 440 445 Leu lle Gly Arg Lys Lys Thr 455

配列番号:17

配列の長さ:368

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lie Asp Leu Thr Asn Phe Leu
20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
35 40 45

Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	1 s V	Ser	Val	Ser	Ser	Va l	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Cln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	i l e	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe (
				95					100					105
Thr	۷al	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
ile	Arg	His	His	Pro	Glu	äis	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Va!	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					i50
Pro	Gli	/ Thi	r Glu	ı Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	Аlа	Leu	Asn	Cly	Arg
				155	i				160	ŀ				165
Gli	u Glo	u Se	r Pro	o leu	Leu	lle	Gly	Gln	Cla	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170)				175	ò				180
Vг	l Pr	o Ar	3 As	p Lei	Giu	ı Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				183	5				190)				195
Le	u 11	e Se	r Tr	p Asi	alk c	Pro	Ala	e Val	The	r Val	Arg	Ty:	Tyr	. YL8
				20)				203	5				210
li	e îh	r îy	r Gl	y Gl	u Th	r (1)	y Cl	y Yzı	n Se	r Pro	o Val	Gli	n Glu	, Phe
				21	5				22	0				225

Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	He	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	lle	Asp	Lys	Pro	Ser	Mel	Ala	lle	λsp	Ala	Pro	Ser	Asn
				275					280					285
Leu	λrg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp
				290					295					300
Gln	Pro	Pro	Arg	λla	Arg	lle	Thr	Cly	Tyr	lle	He	Lys	Tyr	Glu
				305	•				310					315
Lys	s Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Clu	Val	V a l	Pro	Arg	Pro	λrg	Pro
				320)				325	ı				330
G I	y Va	l The	r Glu	ı Ala	Thi	lle	Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	The	Glu
				335	5				340)				345
Тy	r Th	r II	e Ty	r Va	1 []	a Ala	Leu	Lys	s Asr	ı Asn	Glr	ı Lys	Sei	Glu
				350	0				355	5				360
Pr	o Le	u II	e Gl	y λι:	g ly	s Lys	s Thi	r						
				36	5									

配列番号:18

配列の長さ:367

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

記列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg 5 10 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 20 25 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Giu Asp Val Ala Glu Leu 40 35 Ser lle Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 55 50 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin 70 65 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 80 85 Ser Pro Thr Gly lie Asp Phe Ser Asp lie Thr Ala Asn Ser Phe 100 95 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg 115 110 lle Arg His His Pro Clu His Phe Ser Cly Arg Pro Arg Glu Asp 135 130 125 Arg Val Pro His Ser Arg Asa Ser lle Thr Leu Thr Asa Leu Thr 140 145 150 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser lie Val Ala Leu Asn Gly Arg 165 160 155

Glu	Glu	S	er	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gla	Ser	Thr	Val	Ser	YZD
					170					175					180
Val	Pro	A	rg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
					185					190	ı				195
Leu	He	: S	er	Trp	λsp	λla	Pro	λla	Val	Thr	Val	Àrg	Tyr	Tyr	Arg
					200					205	5				210
ile	The	r 1	`y r	Gly	Glu	Thr	Cly	Gly	yzı	Sei	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
					215	•				220)				225
Thr	٧a	1 I	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thi	Ala	a Th	rlle	e Ser	Gly	Leu	Lys
					230)				23	5				240
Pro	Gl	y '	Val	A S I	Ty	r Thi	r 11	e Th	r Va	1 Ty	r Ala	a Vai	Thr	Gly	Arg
					24					25					255
GI	y As	p	Ser	Pr	o Al	a Se	r Se	r Ly	s Pr	o 11	e Se	r 11	e Asr	ı Tyr	Arg
					26					26					270
Th	r Gl	u	110	e As	p Ly	s Pr	o Se	r Me	t As			r Pr	o Pro	o Ara	g Arg
					27					28					285
Αl	a Ai	18	۷a	l Th	r As	p Al	a îh	r Gi	u Ti			e Th	r []	e Se	r Trp
					29						3 5				300
Αr	g T	hr	Ly	s Th			ır II	le Ti	ir G			n Va	l As	p Al	a Val
					30					31				D	315
P	ro A	l 2	λs	n G			ir Pi	o 11	ie G			ir li	e Ly	s Pr	0 Y25
						20	_	_			25		🖘	a -	330
٧	al A	. 7 3	5 9	er T			ie îi	hr G	ly L	_		ro Gi	y in	ir AS	p Ty: 34:
					3	35				- 3	40				J4:

Lys lle Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro 350 355 360

Val Val lie Asp Ala Ser Thr

365

配列番号:19

配列の長さ:464

配列の型:アミノ酸

鎖の数: | 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg 15 5 10 1 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 25 20 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 35 40 Ser lie Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 55 50 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln 70 65 His Clu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 90 85 80

Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	λla	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	He	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	ile	Thr	Gly	Tyr	λrg
				110					115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	87 <i>k</i>	Pro	Arz	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	V a l	Pro	His	Ser	λιζ	λsn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	λsn	Leu	Thr
				140					145					i50
Pro	Gly	Thr	Clu	Tyr	Val	Val	Ser	lie	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	ile	Gly	Cin	Cln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170	}				175					180
Val	Pro	Arg	g Asp	Leu	Glu	ı Val	۷a۱	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185	5				190					195
Le	. I I	e Se	r Trp	Ast) Ala	a Pro	Ala	ya l	Thr	۷al	λrg	у Туг	Tyr	Arg
				200)				205	,				210
[]	e Th	r Ty	r Gly	y Cli	ı Th	r Gly	/ Cl	y yzu	Set	Pro	s¥ c	l Gli	n Glu) Phe
				213					220					225
Th	r Va	l Pr	o Gl	y Se	r Ly	s Se	r Th	r Ala	Th	r II	e Se	r Gl	y Lei	ı Lys
				23					23					240
Pr	o GI	y Va	el As	р Ту	r Th	r II	e Th	r Val	i Ty	r Al	a Va	1 Th	r Gl	y Arg
				24					25					255
G 1	у Аз	sp Se	er Pr	o Al	a Se	r Se	r Ly	s Pro	0 11	e Se	r II	e As	n Ty	r Arg
				26	0				26	5				270

Thr	Glu	lle	Asp	Lys	Pro	Ser	Het	Gly	lle	Arg	Gly	Leu	Lys	Gly
				275					280					285
Thr	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Asp	Gly	Phe	Pro	Gly	Phe	Lys	Cly
				290					295					300
Asp	Met	Gly	ile	Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Glu	lle	Gly	Pro	Pro	Giy
				305					310					315
Pro	Arg	Gly	Glu	Asp	Gly	Pro	Glu	Gly	Pro	Lys	Gly	Arz	Gly	Gly
				320					325					330
Pro	Asn	Gly	Asp	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly
				335					340					345
Lys	Leu	Gly	V a l	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Gly	Arg	Gln	Gly
				350					355					360
Pro	Lys	Gly	Ser	-11e	Gly	Phe	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Ala	Asn	Gly
				365					370					375
Glu	Lys	Gly	Gly	Arg	Gly	Thr	Pro	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly
				380					385					390
Glr	n Arg	Gly	Pro	Thr	Gly	Pro	λrg	Gly	Glu	Arg	Gly	Pro	Arg	Cly
				395					400					405
lis	ខ រិក៖	r Gl	y iy:	s Pro	Gly	Pro	Lys	Cly	λsn	Ser	Gly	Gly	q z £.	Giy
				410)				415					420
Pr	o Ala	a Gl	y Pr	o Pro	Gly	y Glu	Arg	Gly	Pro	Asn	Cly	Pro	Gin	Glÿ
				425	5				430)				435
Pr	o Th	r G1	y Ph	e Pro	Gly	y Pro	ly:	s Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly
				44()				445	<u>, </u>				450

Lys Asp Gly Leu Pro Gly His Pro Gly Gln Arg Gly Glu Thr
455 460

配列番号:20

配列の長さ:432

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg 10 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 25 20 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 35 40 Ser lie Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 50 55 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin 65 70 75 His Glu Ser The Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 90 80 85 Ser Pro Thr Gly lie Asp Phe Ser Asp lie Thr Ala Asa Ser Phe 105 95 100

Thr	Val	His	Trp	He	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	He	Thr	Gly	Tyr	Arg
	•			110					115					120
He	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130			•		135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	ile	Thr	Leu	Thr	Ásn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Cly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175					180
V a l	Pro	Arg	g Asp	Leu	Glu	Val	Yai	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Lei	110	e Se	r Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Туг	Tyr	Arg
				200)				205					210
116	2 Th	r Ty	r Gly	Gli	ı Thi	r GTy	Gly	Asn	Ser	Pro	Va l	Cli	n Glu	Phe
				215	;				220					225
Th	r Va	l Pr	o Gl	/ Sei	r Ly:	s Ser	Thr	Ala	Thr	ile	Ser	Gly	/ Lev	lys
				230)			÷	235	,				240
Pr	o Gl	y Va	l As	p Ty	r Th	r 11e	2 ፒከ0	r Val	Tyr	Ala	s V z	i Th	r Gly	/ Arg
				24	5 _.				250)				255
C I	у Аз	p Se	er Pr	o Al	a Se	r Se	r Ly:	s Pro	119	e Se	r II	2 k s	กโу	r Arg
				26	0				253	5				270
Th	r G	lu l	le yz	p Ly	s Pr	o Se	r Me	t Ala	a Ala	a Gl	y Se	r II	e Th	r Thr
				27	5				28	0				285

Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	λla	Phe	Pro	Pro
				290					295					300
Gly	His	Phe	Lys	Asp	Pro	Lys	Arg	Leu	Tyr	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly
				305					310					315
Phe	Phe	Leu	Arg	He	His	Pro	Asp	Gly	Arg	Val	Asp	Cly	Val	Arg
				320					325					330
Glu	Lys	Ser	Asp	Pro	His	lle	Lys	Leu	Cln	Leu	Gln	Ala	Glu	Glu
				335					340					345
Arg	Gly	Val	Val	Ser	He	Lys	Gly	Val	Cys	Ala	Asn	Arg	Tyr	Leu
				350					355					360
Ala	llet	Lys	Glu	λsp	Gly	λrg	Leu	Leu	Ala	Ser	Lys	Cys	Val	Thr
				365	i				370					375
Asp	Glu	Cys	Phe	Phe	Phe	Glu	Arg	Leu	Glu	Ser	Asn	λsn	Tyr	Asn
				380)				385	i				390
The	Туг	Arg	g Ser	Arg	ly:	s Tyr	Thr	Ser	Trp	Tyr	Val	Ala	Leu	Lys
				393	5				400)				405
λr	Th	r Gl	y Cli	1 Ty	r Ly:	s Leu	Cly	y Ser	Lys	s Thr	Gly	Pro	Gly	Cln
				410	0				413	5				420
Ly.	s Al	a II	e Le	u Ph	e Le	u Pro	о Ме	l Sei	r Ali	a Ly:	s Se	r		
				42	5				43	0				

配列番号:21

配列の長さ:574

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser lie Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp lie Ala Pro Arg Ala Thr lie Thr Gly Tyr Arg lle Arg His His Pro Clu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser lle Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser lie Val Ala Leu Asn Gly Arg

Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	qzk
				170					175					180
Val	Pro	۸rg	λsp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
٠				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	slk	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Va l	Gln	Glu	Pine
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	۷a	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245	i				250					255
Gly	, ysb	Se	r Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	ile	Ser	ile	Asn	Tyr	.Arg
				260)				265					270
Thr	r Glu	ן נ	e yzi	lys	Pro	Ser	Met	Ala	lle	Pro	Ala	Pro	Thr	Asp
				275	5				280)				285
Le	u Ly:	s Ph	e Th	r Glr	n Val	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Trp
				290)				295	5				300
Th	r Pr	o Pr	o As	n Va	l Glr	ı Lei	. Thr	Gly	Туг	Arg	y Val	Arg	Val	Thr
				30	5				310)				315
Pr	o Ly	s G1	u Ly	s Th	r Gly	y Pro	o Me	i Lys	Gli	ıllı	e Asi	n Lei	ıAla	Pro
				32	0				32	5				330
λs	p Se	r Se	r Se	r Va	l Va	l Va	l Se	r Gly	, le	u Me	t Va	l Ala	3 Th	Lys
				33	5				34	0				345

Tyr	Glu	Val	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu	Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg
				350					355					360
Pro	Ala	Gln	Gly	Val	V a I	Thr	Thr	Leu	Glu	Asn	Va l	Ser	Pro	Pro
				365					370					375
λrg	λrg	λla	Arg	Val	Thr	λsp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	lle	Thr	lle
				380					385					390
Ser	Trp	λrg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr	lle	Thr	Gly	Phe	Gla	lsV	Asp
				395					400					405
Ala	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Gln	Thr	Pro	lle	Gln	Arg	Thr	lle	Lys
				410					415					420
Pro	Asp	Val	Arg	Ser	Tyr	Thr	ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr
				425					430					435
Asp	Туг	Lys	s Ile	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Leu	Asn	λsp	λsn	Ala	λrg	Ser
				440	1				445					450
Ser	Pro) Va	l Val	lle	. Asp	λla	Ser	Thr	Ala	lle	Asp	slk	Pro	Ser
				455	<u>, </u>				460					465
A S A	n Le	u Ar	g Phe	e Lei	alk ı	Thr	The	Pro	γzn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser
				47()				475	•				430
֝֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞֞	p Gl	n Pr	o Pri	o Ar	g Ala	a Arg	lle	Tar	Cly	Туг	He	He	Ĺïs	
				48					490					495
Gl	u Ly	s Pr	o Cl	y Se	r Pri	o Pro	y y t	Glu	۷a	l Val	Pro	Yis	Pro	
				50					503					510
Pr	o GI	y Va	l Th	r Gl	u Al	a Thi	r III	e Thr	GI	y Lei	Glu	Pro	Gly	
				51	5				52	0				525

 Glu Tyr Thr
 11e Tyr Val
 11e Ala Leu Lys Asn Asn Gin Lys Ser

 Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gin Leu
 540

 Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp

 Val Pro Ser Thr

請求の範囲

- 1. 穿孔法を用いて外来遺伝子を標的細胞に導入し形質転換細胞を製造する方法において、穿孔法を用いて標的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質の存在下で培養する工程を包含することを特徴とする外来遺伝子による形質転換細胞の製造方法。
- 2. 培養工程が、細胞接着活性物質を被覆した培養器具を用いて培養する工程である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 3. 細胞接着活性物質が、細胞接着活性ポリペプチドまたは該ポリペプチドの機能的同等物である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 4. 細胞接着活性ポリペプチドが、細胞接着伸展活性ポリペプチドである請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。
- 5. 細胞接着伸展活性ポリペプチドが、配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドである請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。
- 6. 細胞接着活性ポリペプチドが、配列表の配列番号3、4および5で表されるポリペプチドから選択される請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。
- 7. 細胞接着性物質がポリーN-p-ビニルベンジルーD-ラクトンアミドである請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 8. 標的細胞が造血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血細胞、ES細胞、リンパ球、癌細胞から選択される細胞である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 9. 外来遺伝子がタンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコード する核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞

内抗体をコードする核酸、偽 (デコイ) 遺伝子から選択される核酸である 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。

- 10. 外来遺伝子がタンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞内抗体をコードする核酸、偽(デコイ)遺伝子から選択される核酸であり、該核酸がベクターに組み込まれている請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 11. ベクターがレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、 ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターから選択される ベクターである請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 12. 穿孔法がエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション 法およびパーティクルガン法から選択される請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 13. 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法によって製造される外来 遺伝子による形質転換細胞。
- 14.請求項1記載の形質転換細胞の製造方法に使用するキットであって、細胞接着活性物質を含有することを特徴とする外来遺伝子による形質転換細胞の製造用キット。

図 1

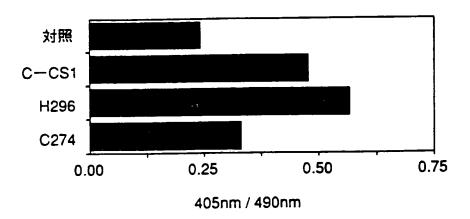
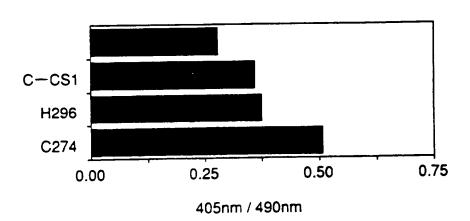


図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02425

A. CLAS	SSIFICATION OF SUBJECT MATTER	1781 <i>4 </i> 78							
	C16 C12N15/87, C12N5/10, C								
	o International Patent Classification (IPC) or to both m	idonal Camilloanon and It C							
	DS SEARCHED	lessification armhale)							
Minimum do	cumenation searched (classification system followed by c	125111C51000 Symbols)							
Int.	C16 C12N15/87, C12N5/10, C	V/R14/ /0							
Documentation	on searched other than minimum documentation to the ext	ent that such documents are included in th	c fields searched						
Electronic da	ta base consulted during the international search (name of	data base and, where practicable, search to	rms used)						
WPI,	WPI/L, BIOSIS PREVIEWS								
C. DOCU	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT								
Category*	Citation of document, with indication, where app	propriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
A	February 28, 1992 (28. 02. 92) & EP, 463508, A & CA, 2044307, A								
A	JP, 6-090771, A (Shiseido C April 5, 1994 (05. 04. 94)(o., Ltd.), Family: none)	1 - 14						
Furth	er documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.							
"A" docum	categories of cited documents: ent defining the general state of the art which is not considered (perfecular relevance	"I" later document published after the inte date and not in conflict with the appli the principle or theory underlying the	ication but cred to encertains : investion						
"E" eartier	document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the considered novel or cannot be consisted when the document is taken along	GOLOG SO INADIAN EN INACEDIAC						
cited to special	o establish the publication date of another citation or other reason (as specified) eat referring to an oral disclosure, use, exhibition or other	"Y" document of particular relevance; the considered to involve an inventive combined with one or more other such	documents, such combination						
"P" docum		being obvious to a person skilled in "&" document member of the same pater	the art						
	actual completion of the international search	Date of mailing of the international se	arch report						
	ch 1, 1996 (01. 03. 96)	March 19, 1996 (1							
Name and	mailing address of the ISA/	Authorized officer							
	anese Patent Office	·							
Enceimile I		Telephone No.							

国際出類3号 PCT/JP 95/02425

	- III -				
A. 発明の属	する分野の分類(国)	系特許分類(IPC))			
			C12N5/10.	C 0 7 K	14/78
3. 異変を行	った分野				
事を行った最	小根資料(国際特許	分類(IPC))			
			C 1 2N 5/10.	C 0 7 K	14/78
	の資料で調査を行っ	た分野に含まれるもの			
3際調査で使用		ス (データベースの名称、関連 I/L. BIOSIS LINE		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
C. 関連する	と認められる文献				
引用文献の カテゴリーキ	引用文章	は名 及び一部の箇所が間違す	るときは、その関連する箇所の	表示	関連する 請求の範囲の参号
A	アンド・カン 28.2月. &EP,46	バニー コーン), 1992(28.02, 3508, A&CA,	2044307, A	/ ース・	1-14
A	5.4月.1		94)(ファミリー:		
* 引用文献の 「A」特に関連 「E」先行文庫 「L」優先権 若をしく! での」ロ頭に 「P」国際出	連のある文献ではなく 飲ではあるが、国際と 主張に投機を接起する は他の特別な理由を看 を付す) よる関示、使用、展売	(、一般的技術水準を示すもの 出願日以後に公扱されたもの 5文献又は他の文献の発行日 軍立するために引用する文献	「丁」国際出願日又は使作 矛盾するものではた に引用するもの 「X」等に関連のある文庫 性又は進歩性がない 「Y」等に関連のある文庫	も日後に公表され はく、発明の原理 まであって、当る いと考えらて、ある まなであって、 とって自明である ももの	た文献であって出職と 又は理論の理解のため (文献のみで発明の新規 の
国際調査を完	7 LtB 01.03	. 96	国際調査報告の発送日	19.03.9	96
1	K国特許庁(Ⅰ	SA/JP) 《関三丁目 4 番 3 号	特許庁等査官 (権限のある職 高 福 栄 電話番号 03-3581-	=	3 4 4 9

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:
☐ BLACK BORDERS
☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
☐ FADED TEXT OR DRAWING
BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.